

---

**“MUTAZIONI NEL RECETTORE DELLA MELANOCORTINA 3 ASSOCIATE  
AD OBESITA' GRAVE”**

---

**Dott. Francesco Aversano**

Dottorato in Scienze Biotechnologiche – XXIII ciclo  
Indirizzo Biotechnologie Mediche  
Università di Napoli Federico II







---

**“MUTAZIONI NEL RECETTORE DELLA MELANOCORTINA 3 ASSOCIATE  
AD OBESITA’ GRAVE”**

---

**Dott. Francesco Aversano**

Dottorando:	Dott. Francesco Aversano
Relatore:	Prof. Francesco Salvatore
Correlatore:	Prof. Pasqualina Buono
Coordinatore:	Prof. Giovanni Sannia



*A mia moglie Maria*

*luce e faro della mia vita.*



## INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	1
<b>SUMMARY</b>	5
<b>1. INTRODUZIONE</b>	6
1.1 <i>Definizione ed epidemiologia dell'obesità</i>	6
1.2 <i>Sovrappeso ed obesità nel mondo</i>	7
1.3 <i>Sovrappeso ed obesità in Italia</i>	8
1.4 <i>Eziopatogenesi dell'obesità</i>	10
<b>2. LA SINDROME METABOLICA</b>	12
2.1 <i>Criteri per l'identificazione</i>	12
<b>3. SUSCETTIBILITA' GENETICA</b>	13
3.1 <i>Ruolo del SNC nel controllo del bilancio energetico</i>	13
<b>4. SISTEMA DELLA MELANOCORTINA</b>	18
4.1 <i>IL Recettore 3 della melanocortina</i>	20
<b>5. SCOPO DELLA TESI</b>	24
<b>6. MATERIALI E METODI</b>	24
6.1 <i>Soggetti</i>	24
6.2 <i>Amplificazione del DNA genomico e sequenziamento</i>	26
<b>7. RISULTATI</b>	28
<b>8. DISCUSSIONE</b>	30
<b>9. BIBLIOGRAFIA</b>	31

## RIASSUNTO

L'obesità è una patologia cronica, ad eziologia multifattoriale, caratterizzata da elevato peso corporeo dovuto ad eccessivo accumulo di tessuto adiposo. Obesità e sovrappeso sono importanti fattori di rischio per mortalità prematura e numerose patologie croniche quali: diabete mellito di tipo 2, ipertensione, dislipidemia, cancro del colon, complicanze respiratorie ed osteoartriti di grandi e piccole articolazioni. L'incidenza di tale patologia è aumentata enormemente nell'ultimo decennio ed è in continua crescita. Sovrappeso e obesità sono in costante e rapido aumento in molte parti del mondo non solo nei paesi industrializzati ma anche in quelli in via di sviluppo, tanto da indurre l'OMS ad utilizzare la definizione di "pandemia".

Più di un miliardo di adulti nel mondo sono in sovrappeso ed almeno 300 milioni di questi sono obesi e, i bambini sotto i 5 anni di età in sovrappeso o obesi sono più di 22 milioni, mentre quelli in età scolare (5-17 anni) sono circa 155 milioni (10 % del totale) di cui 30-45 milioni sono obesi (1 su 10). La componente genica incide per circa il 30% sullo sviluppo dell'obesità, lo stile di vita (dieta, esercizio fisico) insieme ad altri fattori ambientali incidono per il restante 70%. Finora sono stati identificati circa 240 geni suscettibili di obesità grave nell'uomo. In particolare, è stato rimarcato il ruolo importante del sistema della melanocortina nella regolazione dell'omeostasi energetica e nello sviluppo dell'obesità nell'uomo. Le melanocortine sono ormoni peptidici derivanti dal taglio proteolitico della proopiomelanocortina (POMC) e comprendono  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -MSH (melanocyte stimulating hormone) ed adrenocorticotropina (ACTH). Sono stati individuati cinque recettori della melanocortina (MCRs) con cui essi interagiscono. Il recettore 1 (MC1R) è espresso nei melanociti e media gli effetti sulla pigmentazione della pelle e dei capelli. Il recettore 2 (MC2R), espresso soprattutto nella corteccia surrenalica, media gli effetti dell'acetilcolina (ACTH) sulla sintesi e il rilascio dei glucocorticoidi. I recettori 3 e 4 (MC3R, MC4R) sono espressi nel cervello e soprattutto nelle aree ipotalamiche coinvolte nella regolazione del bilancio energetico. In particolare il recettore 3 (MC3R) è localizzato nell'ipotalamo e nel sistema limbico ed è espresso ad alti livelli nei neuroni arcuati, inclusi i neuroni esprimenti POMC. Il recettore 4 (MC4R) è più ampiamente distribuito nel cervello, nell'ipotalamo, nel talamo e nella corteccia. Esso è particolarmente rappresentato nel nucleo paraventricolare e nell'area ipotalamica laterale, che sono quelle più importanti nella regolazione del bilancio energetico. Il recettore 5 (MC5R) è espresso nelle ghiandole esocrine e nel muscolo scheletrico. L'alterazione o la distruzione di MC1R, MC2R e MC5R determina, rispettivamente, anomalie nella pigmentazione, nella produzione degli steroidi a livello del surrene, nella funzione delle ghiandole esocrine, ma non alterazioni nell'omeostasi energetica. Al contrario, alterazioni o distruzioni di MC3R e MC4R provocano uno scompenso nel bilancio energetico con conseguente iperfagia e obesità. La  $\beta$ -endorfina e gli altri peptidi MSH sembrano avere effetti sulla regolazione neuroendocrina, sul dolore, sul comportamento e sulla funzione immune. Le melanocortine mediano l'azione della leptina sul controllo dell'omeostasi energetica tramite l'interazione con i recettori della melanocortina (MC-Rs) 3 e 4 espressi nel nucleo ipotalamico laterale. La leptina (il cui nome deriva dal greco leptos che vuol dire magro) è un ormone prodotto dal tessuto adiposo e regola il senso di sazietà. I recettori MC3R ed MC4R, regolano l'omeostasi energetica principalmente attraverso il legame



competitivo col peptide anoressizzante  $\alpha$ -MSH ed il peptide oressizzante agouti, (Ag-RP). Mutazioni in eterozigosi nei recettori MC3R e MC4R sono state riscontrate in associazione con forme precoci di obesità, accompagnate da un irregolare comportamento alimentare, una severa iperinsulinemia e un incremento nello sviluppo della massa grassa. Il deficit funzionale del recettore 4 della melanocortina (MC4R) rappresenta la causa più frequente di obesità monogenica nell'uomo con un'incidenza del 4-5% nella popolazione adulta.

Il gene del recettore MC3R codifica per l'isoforma 3 del recettore melanocortinico (MC3R), è localizzato sul cromosoma 20 e mappa nella regione 20q13.2-q13.3. Il gene codifica per una proteina di 360 aminoacidi (1083 nucleotidi, Genbank L06155) associata alle proteine G.

Nell'uomo sono state identificate tre mutazioni missenso in eterozigosi (Ile183Asn, Ala70Thr, and Met134Ile) associate ad obesità in età evolutiva ad insorgenza precoce. I soggetti eterozigoti per le tre mutazioni presentano un aumento della massa grassa e più alti livelli di leptina rispetto ai soggetti obesi non portatori di mutazioni nel gene MC3R. Infine, sia i topi *knock-out* per MC3R sia quelli per MC4R sono entrambi obesi ma, a differenza dei secondi, i topi *knock-out* per MC3R non sono iperfagici. Inoltre, i topi *knock-out* per entrambi i geni presentano un fenotipo obeso più grave rispetto ai topi MC3R<sup>-/-</sup> e ai topi MC4R<sup>-/-</sup>, dimostrando che entrambi i geni sono importanti e non ridondanti.

Il presente progetto di ricerca prevede l'identificazione di nuove mutazioni nel gene che codifica per MC3R associate ad obesità grave in una popolazione locale. Durante questi tre anni ho provveduto allo *screening* del gene MC3R in una coorte di 50 soggetti adulti gravemente obesi con Body Mass Index (BMI) >40 e su 100 soggetti normopeso (gruppo controllo) 19 < BMI < 24,9 utilizzando reazioni di PCR e sequenziamento al fine di identificare nuove varianti associate ad obesità grave. La coorte di soggetti gravemente obesi era stata oggetto dello screening di MC4R nel laboratorio di ricerca dove ho svolto la tesi. La popolazione in studio era costituita da pazienti severamente obesi non imparentati, di età compresa tra i 17 e 70 anni, reclutati dal Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università "Federico II" di Napoli. Tutti i soggetti erano caucasici e vivevano in Italia da oltre tre generazioni. I criteri di inclusione erano: assenza di diabete trattato, assenza di malattie coronariche, assenza di ipertensione trattata e presenza di obesità grave (BMI>40 kg/m<sup>2</sup>).

Le caratteristiche biochimico cliniche dei soggetti severamente obesi oggetto dello studio sono descritte in un precedente lavoro e sono riportate nella tabella 1.

## Risultati

L'analisi del gene MC3R effettuata nella popolazione di studio rispetto al gruppo di controllo ha evidenziato 2 polimorfismi già descritti in letteratura (tab. 2).

Tabella 2. Elenco mutazioni e polimorfismi trovati nel gene MC3R

	Cambio Nucleotidico	Cambio Aminoacidico	Obesi, n (%) 50	Controlli, n (%) 100
POLIMORFISMI	c.17 C>A / c.241 G>A (eterozigosi composita)	p. Thr 6 Lys / p. Val 81 Ile  Frequenza allelica 6%	6 (1,2%) Frequenza allelica 6%	6 (6%)
	c.17 C>A / c.241 G>A (omozigosi)	p. Thr 6 Lys / p. Val 81 Ile	1 (2%)	0 (0%)
MUTAZIONI	c. 283 C > T eterozigosi	p. Leu95Leu	1 (2%)	0 (0%)

Il polimorfismo in eterozigosi c.17 C>A / c.241 G>A è stato identificato in sei soggetti obesi ed in sei soggetti normopeso con una percentuale del 1.2% negli obesi e del 6% negli adulti normopeso. Lo stesso polimorfismo (c.17 C>A / c.241 G>A) in omozigosi è stato riscontrato in un solo soggetto obeso con una percentuale del 2%. E' stato inoltre identificata una sola mutazione in eterozigosi (nt 283 C >T) presente solo in un soggetto obeso che non comporta cambio aminoacidico (L95L) con una percentuale del 2%.

## CONCLUSIONI

Un recente lavoro ha dimostrato che la presenza in omozigosi delle due varianti polimorfiche *Thr 6 Lys* e *Val 81 Ile* in MC3R è associata a insorgenza precoce dell'obesità infantile. Entrambe le varianti in omozigosi erano state identificate solo tra i bambini che erano in sovrappeso con un BMI > 95° percentile. Questi bambini presentavano elevati livelli di massa grassa, alti livelli di insulina e leptina, rispetto ai bambini normopeso o ai bambini eterozigoti per le varianti polimorfiche descritte. Inoltre l'analisi funzionale in vitro delle due varianti polimorfiche in omozigosi ha mostrato una ridotta produzione intracellulare di c-AMP (in vitro) rispetto allo studio condotto con le stesse varianti polimorfiche in eterozigosi in seguito al legame del ligando ( $\alpha$ -MSH) al recettore. E' interessante notare che le due varianti polimorfiche Thr6Lys e Val81Ile si trovano, rispettivamente, nella regione NH2-terminale extracellulare e nel primo tratto dell'elica transmembrana della proteina MC3R. Entrambe le mutazioni potrebbero influire sulla funzionalità di MC3R, in particolare si ritiene che proprio il primo tratto transmembrana, dove cade una delle due varianti polimorfiche (Val81Ile), sia coinvolto

nel legame con il ligando  $\alpha$ -MSH (fig.16). Mediante studi di affinità di legame è stato dimostrato, che il doppio mutante in omozigosi ha una ridotta capacità di legame, vi è cioè una diminuita affinità con il ligando e  $\alpha$ -MSH, supportato anche da diminuita produzione di c-AMP intracellulare. In conclusione, le variazioni in MC3R sono state evidenziate nel 9,3% della coorte esaminata (14/150), tali risultati sono completamente in accordo con i recenti dati della letteratura relativi alla popolazione europea.

## SUMMARY

**Introduction:** Melanocortin 3 receptor (MC3R) plays a critical role in weight regulation of rodents, but its role in humans remains unclear.

**Objective:** Identification of MC3R genetic variants associated with severe human obesity.

**Methods:** 50 severely obese individuals (BMI >40) and 100 normal-weight healthy volunteers were analyzed. A total of 50 unrelated nondiabetic severely obese [28 females and 22 males; mean (SD) age, 32.2 (11.5) years; mean body mass index, 48.8 (8.1) kg/m<sup>2</sup>] and 100 normal-weight healthy volunteers (34 males and 66 females) entered the study. *MC3R* gene was genotyped by sequencing analysis. Leptin, insulin, glucose, and the lipid profile were measured in fasting serum samples. Anthropometric measurements, sitting blood pressure, and heart rate were also recorded.

### Results:

The population has been characterized for MC3R gene. In parallel, the same experiment was conducted on the population control subjects consisting of normal weight. In the population studied polymorphisms Thr 6 Lys and Val 81 Ile were found in 12% of obese subjects and in 6.0% of normal weight controls. Only obese Thr 6 Lys and Val 81 Ile was found in double heterozygosity in 6 severe obese subject (12%); otherwise, Thr 6 Lys and Val 81 was found one subject (2%) in double homozygous. Mutations Leu 95 Leu found in one subject (2%) was silent.

## CONCLUSIONS

Family studies showed that the genetic component in the onset of obesity plays an important role oscillating between 10-70%. Among the genes that MC3R, belonging to the melanocortin circuit, appears very promising. The melanocortin system, which includes  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - MSH, ACTH (POMC) peptides derived from POMC cleavage and the melanocortin receptors (MCR-s) are genes whose mutations are tightly associated with obesity in humans. In particular, mutations in the MC3R gene forms are responsible for obesity in humans. The MC3R gene analysis performed in our severely obese population showed two polymorphisms already described in literature. One study evidenced two polymorphisms variants (Thr 6 Lys and Val 81) yet decided in heterozygosity and a novel mutation, 283 C > T, that gave silent mutation in another subject.

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 - Definizione ed epidemiologia dell'obesità

L'obesità è una patologia cronica ad eziologia multifattoriale definita dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) come una "condizione caratterizzata da eccessivo peso corporeo per accumulo di tessuto adiposo, in misura tale da influire negativamente sullo stato di salute". Nella pratica clinica, il peso corporeo è comunemente valutato mediante l'indice di massa corporea (BMI), ottenuto dal rapporto tra il peso corporeo di un individuo, espresso in chilogrammi, ed il quadrato della sua altezza, espressa in metri (Fig. 1). Secondo i criteri stabiliti dall'OMS, si definiscono "obesi" soggetti che presentano un valore di BMI uguale o superiore a 30; in particolare, si distingue un'obesità di I, II e III grado quando i valori di BMI sono rispettivamente tra 30-34,9, tra 35-39,9 e maggiori di 40. Inoltre, si definiscono "sottopeso" i soggetti con valori di BMI inferiori a 18,5, "normopeso" quelli i cui valori sono compresi tra 18,5-24,9 e sovrappeso quando i valori di BMI sono compresi tra 25 a 29,9 (Fig.2).

**Calcolo del BMI**  
(Body Mass Index o  
Indice di Massa Corporea)

$$\text{BMI} = \frac{\text{peso (in Kg)}}{\text{altezza (in m)}^2}$$

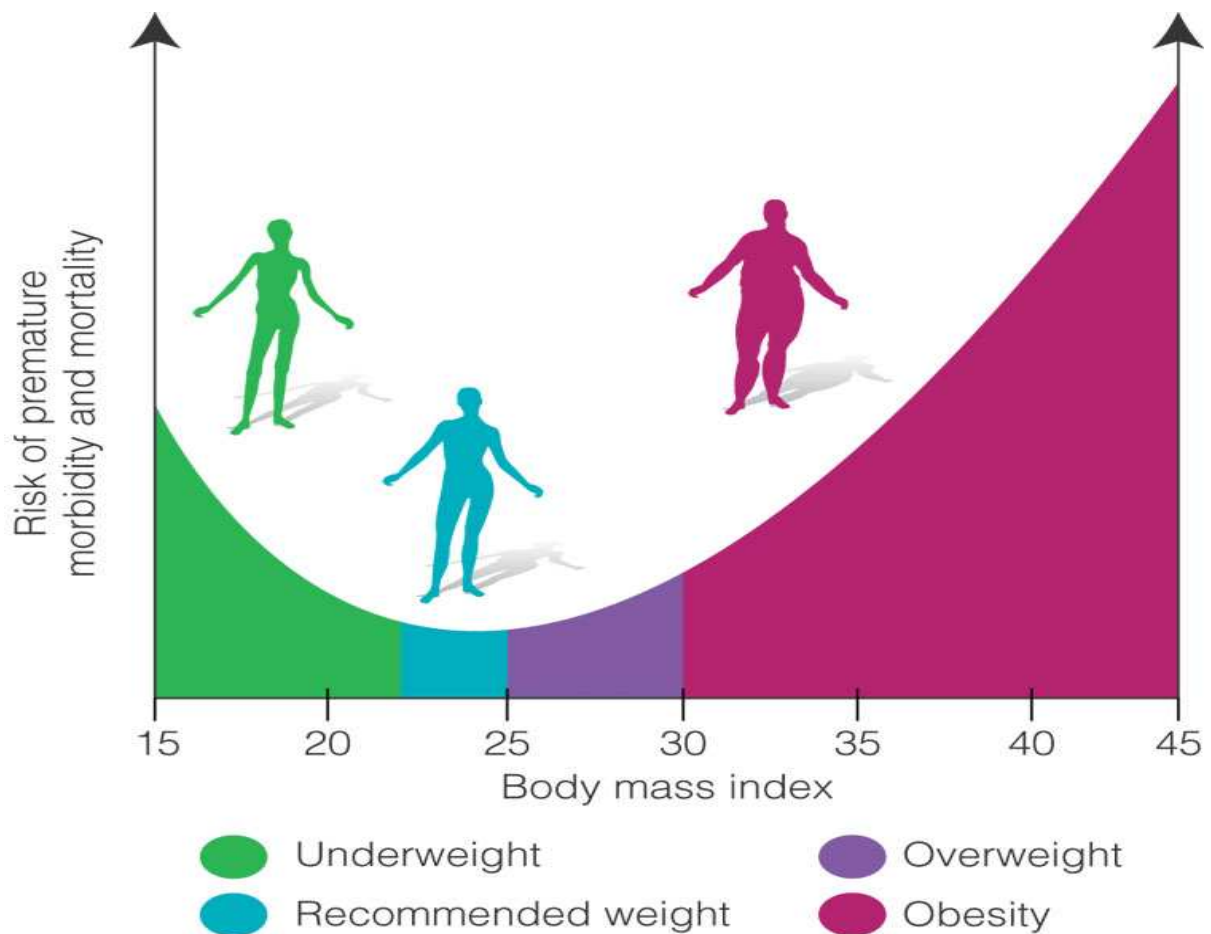
**FIGURA 1**

<b>Classificazione in base all'indice di massa corporea</b>		
<i>NHI</i>	<i>BMI</i>	<i>OMS</i>
Sottopeso	< 18,5	Sottopeso
Peso normale	18,5 - 24,9	Peso normale
Sovrappeso	25 - 29,9	Preobesità
Obesità di I grado	30 - 34,9	Obesità I grado
Obesità di II grado	35 - 39,9	Obesità II grado
Obesità di III grado (grande obesità)	≥ 40	Obesità III grado (grande obesità)

**FIGURA 2**

Essere sovrappeso od obeso aumenta il rischio di morbidità e mortalità correlata dall'insorgenza di altre patologie quali diabete mellito di tipo 2, ipertensione, cardiopatie e alcune forme neoplastiche (1). L'obesità rappresenta il più comune disordine nutrizionale nel mondo occidentale e la sua prevalenza è in progressivo aumento anche nei paesi in via di sviluppo (2). Dal "Rapporto del 2002 sulla Salute nel Mondo" dell'OMS

risulta che globalmente circa il 58% dei casi di diabete, il 21% delle cardiopatie ischemiche e dall' 8% al 42% di determinate forme di cancro sono associate ad un BMI>21. Inoltre, esistono numerosi studi epidemiologici che indagano i nessi tra l'eccessiva assunzione di cibo, con conseguente sovrappeso e obesità, e l'aumento della mortalità da tutte le cause (3-4) (Fig. 3).



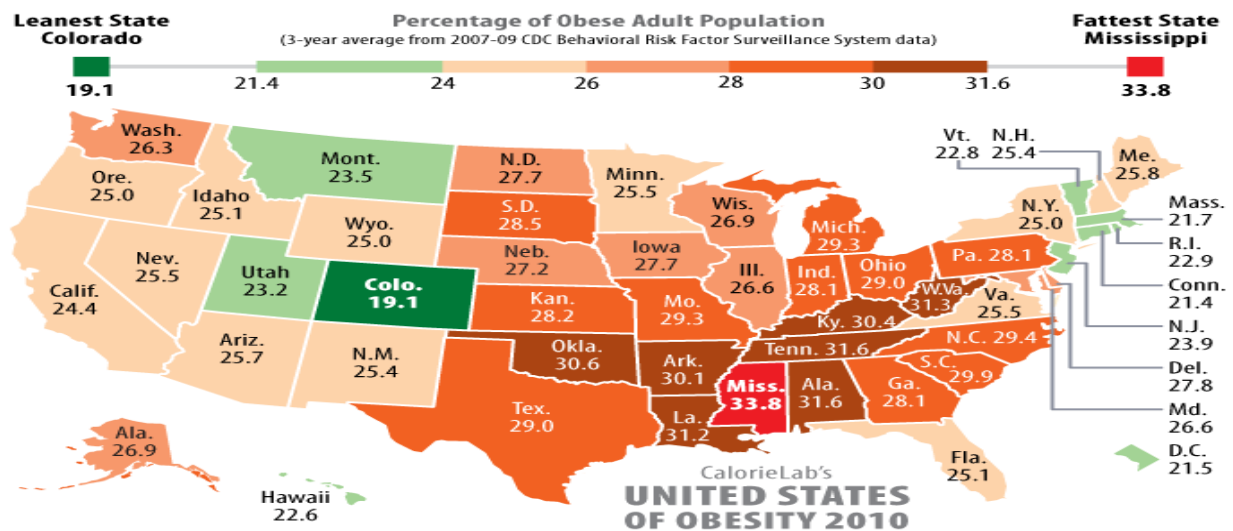
**FIGURA 3: BMI e rischio di morbidità e mortalità**

### **1.2 Sovrappeso ed obesità nel mondo**

Sovrappeso e obesità sono in costante e rapido aumento in molte parti del mondo non solo nei paesi industrializzati ma anche in quelli in via di sviluppo. Recenti stime dell'OMS evidenziano che più di un miliardo di adulti nel mondo sono in sovrappeso ed almeno 300 milioni di questi sono obesi. Questa patologia è in drammatico aumento anche in età evolutiva: bambini sotto i 5 anni di età in sovrappeso o obesi sono più di 22

milioni, mentre quelli in età scolare (5-17 anni) sono circa 155 milioni (10 % del totale) di cui 30-45 milioni obesi (1 su 10). Se non verrà intrapresa alcuna iniziativa, sulla base delle tendenze correnti, si prevede che i livelli di obesità continueranno ad aumentare ed il numero degli adulti in sovrappeso sarà il doppio di quelli sottopeso (5).

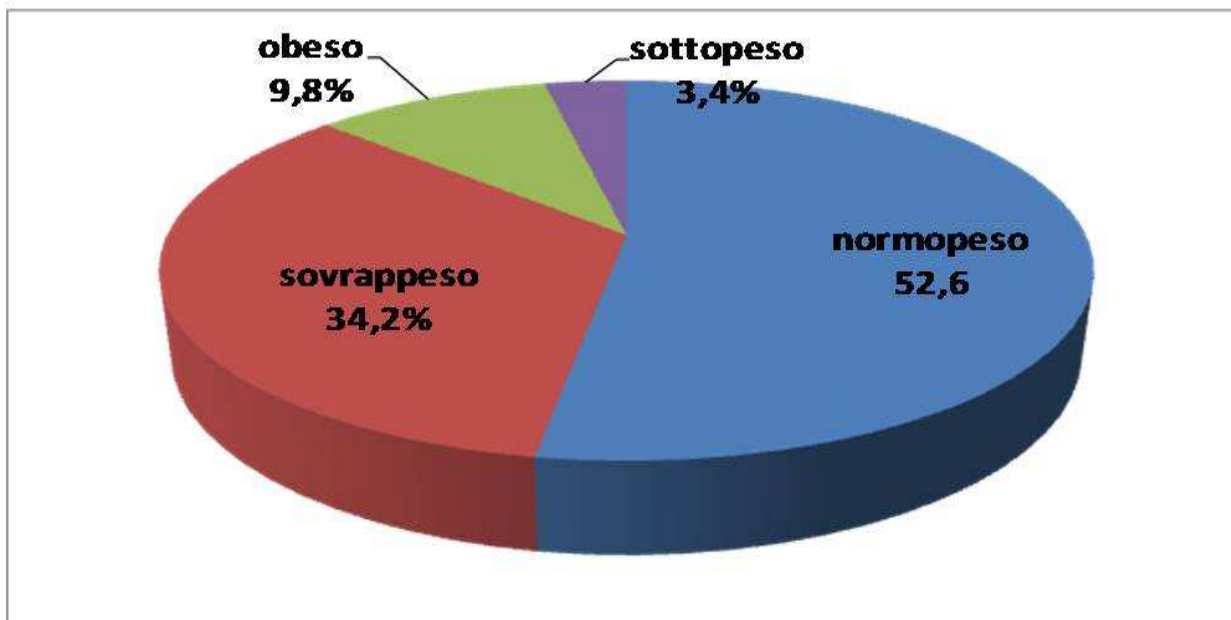
Il problema è particolarmente grave negli Stati Uniti dove recenti stime evidenziano che oltre la metà della popolazione adulta è in sovrappeso e la prevalenza dell'obesità è di circa il 30 % con aumento evidente negli ultimi venti anni (6-7) (Fig. 4 ). Si calcola che tra la popolazione adulta esaminata, il 60.5% è in sovrappeso, il 23.9% obeso, e il 3.0% estremamente obeso; questo incremento è tendenzialmente in linea con quelli registrati nei paesi europei (8-9).



**FIGURA 4. Prevalenza del sovrappeso e obesità negli Stati Uniti (indagine Calorie Lab's United States of Obesity 2010) (7).**

### 1.3 Sovrappeso ed obesità in Italia

Recenti dati ISTAT evidenziano che in Italia sono oltre 4,7 milioni le persone adulte obese in Italia. Nel nostro paese tra il 2002 ed il 2005, si è rilevato un aumento della prevalenza del sovrappeso e dell'obesità di circa l'1,5%. In totale il 34,2% della popolazione è in sovrappeso mentre il 9,8% della popolazione è obesa (fig.5).

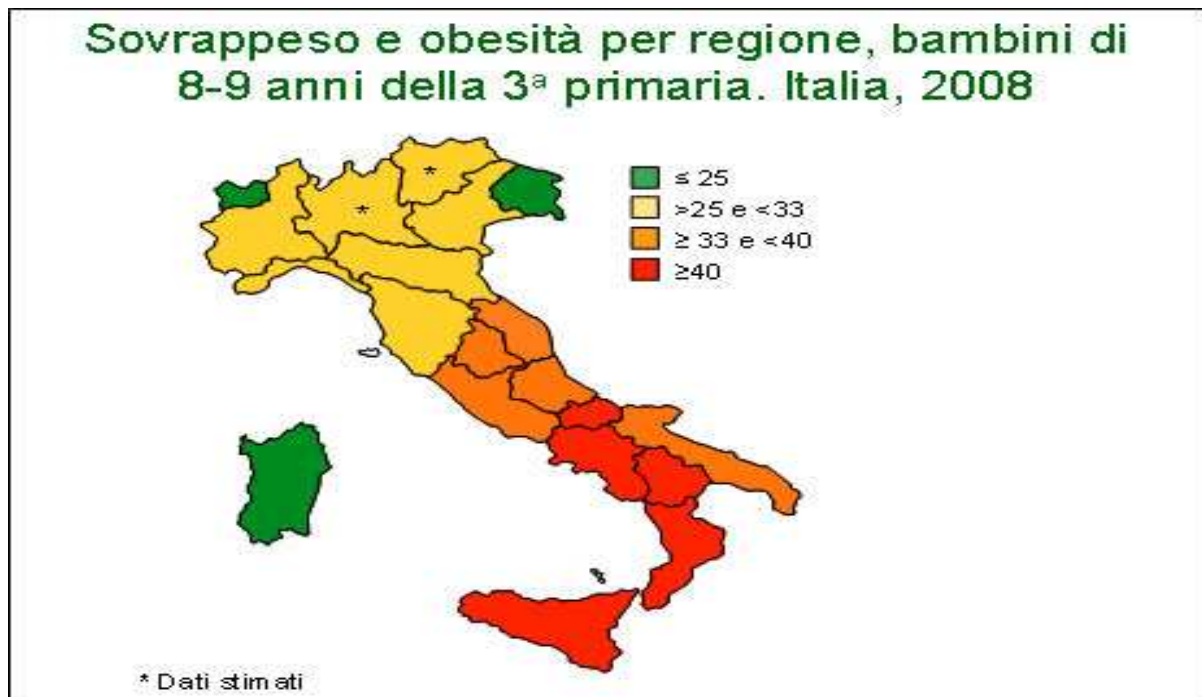


**FIGURA 5. Sovrappeso ed obesità in Italia - Dati ISTAT 2007**

Il sovrappeso è nettamente prevalente nei maschi mentre l'obesità è solo di poco prevalente in questo sesso. In generale, il problema obesità si concentra soprattutto al Sud Italia e tra le fasce di popolazione con basso status socioeconomico. Netta è la relazione tra basso livello di istruzione ed eccesso ponderale: tra gli adulti con titolo di studio medio-alto la percentuale degli obesi si attesta intorno al 5% mentre triplica tra le persone che hanno conseguito al massimo la licenza elementare (15,8%). L'analisi della distribuzione territoriale del fenomeno rivela profonde differenze: al Meridione, in cui l'11.4% della popolazione è obesa, si contrappone il Nord-Ovest con il 7.5% sopra la soglia dell'obesità.

Sovrappeso e obesità in età evolutiva rappresentano un problema molto preoccupante anche in Italia che interessa i maschi in misura maggiore rispetto alle femmine nella fascia di età compresa tra 6-13 anni. La regione con più alto numero di bambini in sovrappeso o obesi è la Campania (36 % e fino al 40 % nella popolazione scolare napoletana) (9) mentre il numero più basso di bambini sovrappeso/obeso è in Valle d'Aosta (14,3 %); in genere si nota come il problema dell'obesità infantile peggiori scendendo dal nord al sud del Paese. Per ciò che concerne i principali fattori di rischio dell'eccesso di peso dei ragazzi con età compresa tra i 6 e i 17 anni, sono da prendere in considerazione la familiarità (componente genetica) e l'ambientale socioculturale in cui vive l'alimentazione e la sedentarietà (Fig.6) .



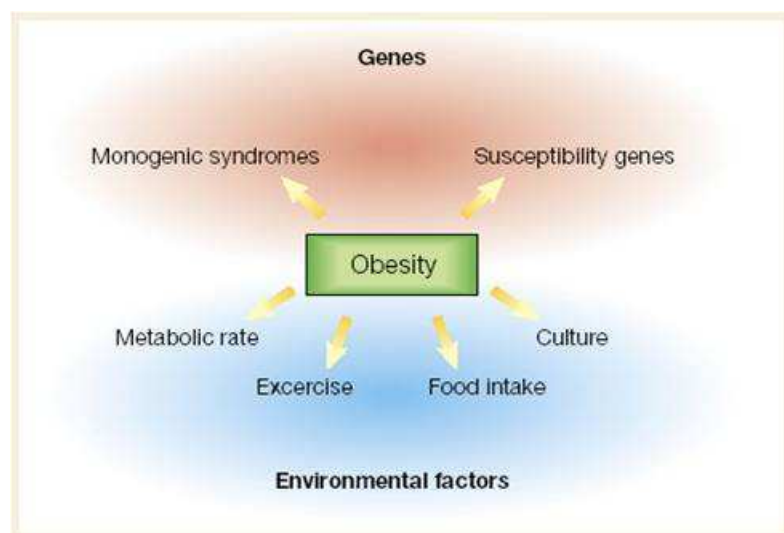


**FIGURA 6.** Bambini ed adolescenti con eccesso di peso in Italia.  
Progetto "OKkio alla Salute" Istituto superiore di Sanità anno 2008.

#### **1.4 Eziopatogenesi dell'obesità**

L'obesità riconosce come eziologia cause multiple. E' una malattia complessa dovuta a fattori genetici, ambientali ed individuali con conseguente alterazione del bilancio energetico ed accumulo eccessivo di tessuto adiposo. Molti studiosi ed esperti concordano nel sottolineare l'esistenza di una forte interrelazione fra fattori genetici, fisiologici, metabolici, comportamentali e psicosociali. Studi su famiglie e gemelli hanno sempre sostenuto l'ipotesi di un'influenza genetica, responsabile delle cosiddette anomalie metaboliche che faciliterebbero l'insorgenza dell'obesità, in presenza di alta disponibilità di alimenti e sedentarietà cronica. Esistono poi fattori individuali che possono contribuire all'eccessiva introduzione di cibo: si tratta solitamente di comportamenti impulsivi o compulsivi secondari a depressione e/o ansia. L'obesità è quindi la risultante della combinazione variabile di due elementi: la suscettibilità genetica, cioè una predisposizione genetica dell'individuo a diventare obeso e la presenza di fattori ambientali (es.: facile accesso ad alimenti altamente energetici, sedentarietà). Si ritiene che la componente genetica incida per il 30-40% e quella ambientale/comportamentale per il rimanente 60-70% (10). Lo sviluppo economico, la modernizzazione e l'urbanizzazione hanno portato ad un cambiamento dello stile di vita che ha favorito un aumento dell'introito calorico e la riduzione del dispendio energetico causando un maggior accumulo di grasso. Sebbene l'organismo umano abbia adattato i meccanismi fisiologici per difendersi dalla perdita di peso corporeo, esso ha invece

scarse difese contro l'aumento di peso quando il cibo è abbondante. Il controllo delle dimensioni delle porzioni, il consumo di una dieta povera in grassi e una regolare attività fisica sono comportamenti che prevengono l'obesità. Inoltre si è più volte sottolineata la rilevanza assunta dagli aspetti psico-sociali in relazione all'insorgenza e alla diffusione della patologia. Da questo punto di vista, l'aumento dell'obesità viene collegato a fattori molteplici: la relativa abbondanza di cibo, lo stile di vita sempre più sedentario, i ritmi frenetici che inducono a comportamenti affrettati anche in relazione all'assunzione dei pasti. Nel corso degli ultimi anni le ricerche svolte per migliorare la comprensione dello sviluppo dell'obesità hanno portato sempre più a considerare anche i fattori genetici come pedine fondamentali nell'insorgenza dell'obesità umana come sottolineato da numerosi studi atti a valutare il ruolo dei fattori genetici ereditari familiari (fig.7).



**FIGURA 7: Fattori che influenzano lo sviluppo dell'obesità.**

Kopelman P.G., (2000). Obesity as a medical Problem *Nature*. 404: 635-643.

Esistono numerosi lavori che insistono sull'elevata incidenza dell'obesità nei figli di genitori obesi: le cifre variano da un'incidenza intorno al 40% se un solo genitore è obeso, ad oltre il 70% se lo sono entrambi. Tuttavia, sarebbe del tutto errato parlare dell'obesità senza tenere conto dei fattori ambientali, dal momento che alcuni genotipi prosperano in un determinato ambiente e meno in un altro e, viceversa, un certo ambiente esalterà alcune manifestazioni e ne inibirà altre (11). L'obesità è ampiamente riconosciuta come una malattia ad andamento cronico, che può avere un notevole impatto sulla salute collettiva. Non solo è uno dei maggiori fattori determinanti in molte

malattie non trasmissibili come il diabete mellito non insulino-dipendente e malattie coronariche, ma incrementa anche il rischio di disturbi biliari e di alcuni tipi di cancro. Malgrado tali evidenze, e senza prestare attenzione alla pressione sociale che impone di essere magri, la prevalenza degli obesi sta crescendo, tanto da indurre gli esperti a credere che l'obesità debba essere ritenuta uno dei maggiori e più trascurati problemi di salute pubblica del nostro tempo.

## **2 - La Sindrome Metabolica**

È noto ormai da tempo che l'eccesso di grasso corporeo possa determinare gravi conseguenze alla salute. Negli ultimi anni, l'obesità sembra sia stata classificata tra i principali fattori che determinano quella che prima era stata definita Sindrome X, poi Sindrome dell' insulino-resistenza e più di recente, Sindrome Metabolica.

Attualmente la sindrome è stata rinominata "plurimetabolica", comprendendo l'associazione di insulino-resistenza, obesità centrale, diabete mellito di tipo 2, dislipidemia e ipertensione arteriosa. Sebbene il meccanismo patogenetico che sottende la Sindrome Metabolica non sia pienamente conosciuto, la causa scatenante sembra essere l'insulino-resistenza, stato metabolico caratterizzato da una diminuzione della normale risposta degli organi bersaglio alle concentrazioni fisiologiche dell'insulina stessa.

La prevalenza della Sindrome Metabolica è estremamente variabile, oscillando dal 15% nelle popolazioni asiatiche al 25-30% nei paesi occidentali, in relazione alla più alta prevalenza di sovrappeso ed obesità nelle popolazioni americane e nord-europee. In Italia, le indagini di popolazione sono piuttosto scarse; complessivamente i pochi dati disponibili indicano una prevalenza del 15-24% negli uomini e del 18-27% nelle donne con un andamento in aumento con l'avanzare dell'età (12).

### **2.1 Criteri per l'identificazione**

Nel 2001 il comitato di esperti del *National Cholesterol Education Program (NCEP-ATPIII)* ha stabilito dei criteri diagnostici, proponendo come metodo per identificare la patologia la presenza nello stesso paziente di tre o più dei seguenti disordini:

- Circonferenza vita: oltre i 102 cm nei maschi ed 88 cm nelle femmine;
- Glicemia a digiuno: oltre 110 mg/dl;
- Pressione arteriosa: oltre i 130/85 mm Hg;
- Trigliceridemia: oltre i 150 mg/dl;
- Colesterolo HDL: inferiore a 40 mg/dl nei maschi e 50 mg/dl nelle femmine

A questi si aggiunge un importante fattore di rischio, l'età, che è determinante a partire dai 45 anni negli uomini e dai 55 nelle donne (13). La sindrome plurimetabolica può essere considerata una patologia preclinica che apre la strada all'insorgenza della malattia cardiovascolare aterosclerotica, la quale rappresenta oggi la principale causa di morbidità e mortalità nei paesi industrializzati.

### **3. Suscettibilità Genetica**

Nell'uomo la determinante genetica dell'obesità è comprovata dalla familiarità dell'obesità, dalla correlazione del sovrappeso nei gemelli monoovulari, dall'esistenza di gruppi etnici, come gli Indiani Pima, geneticamente obesi. Il fatto che in una stessa famiglia ci sia una frequenza maggiore di obesi rispetto alla frequenza casualmente attesa non dimostra necessariamente una trasmissione ereditaria della malattia, dal momento che si potrebbe imputare ad un effetto delle abitudini di vita e di alimentazione del nucleo familiare stesso.

Tuttavia il fatto che il peso corporeo dei figli adottivi si correli con quello dei genitori naturali in modo significativo e non si correli invece con quello dei genitori adottivi dimostra in modo inconfutabile il ruolo fondamentale della trasmissione genetica dell'obesità rispetto al condizionamento ambientale (14). In realtà, le influenze genetiche sembrano agire soprattutto attraverso la suscettibilità di alcuni geni, che possono aumentare il rischio di sviluppare l'obesità, ma non sono sufficienti, da soli, a spiegare lo sviluppo della malattia.

La complessa e solo in parte nota teoria eziologica che spiegherebbe l'insorgenza dell'obesità dal punto di vista genetico si basa sul concetto di "adipostato": la regolazione del peso corporeo è un meccanismo finemente regolato, in modo integrato, da numerose vie nervose, ormonali e metaboliche.

#### **3.1 Ruolo del SNC nel controllo del bilancio energetico**

La regolazione del peso corporeo dipende dal bilancio energetico complessivo che è il risultato del rapporto tra l'energia introdotta e quella consumata. L'energia entra nell'organismo con gli alimenti e in parte mobilizzata dai depositi di tessuto adiposo ed esce come calore e lavoro. Il dispendio energetico totale, può essere suddiviso in tre principali componenti: quello obbligatoriamente richiesto per il normale funzionamento delle cellule e degli organi (MB); quello utilizzato per svolgere attività fisica (AF); e il dispendio attribuito alla termogenesi adattativa, che è la produzione di calore in risposta alla temperatura ambientale o alla dieta (TID).

L'obesità è il risultato di un prolungato squilibrio nel bilancio energetico tra la quantità di calorie assunte e quelle consumate o dalla combinazione di entrambe.

Se l'introito calorico supera la spesa energetica, l'eccesso di energia viene immagazzinata come riserva di grasso negli adipociti. L'organismo umano è caratterizzato da un "set point" che è in grado di riconoscere la quantità dei depositi adipocitari e conseguentemente di regolare il consumo calorico al fine di evitarne l'"accumulo". Questo sistema è caratterizzato da stimoli afferenti ed efferenti; i primi arrivano all'ipotalamo mentre i secondi attivano un processo omeostatico che permette di bilanciare i depositi adipocitari. L'ipotesi che esista un "set point" del peso corporeo in ciascun individuo è suggerita da meccanismi fisiologici che hanno dimostrato come nel tessuto adiposo esistano "sensori" in grado di indicare l'entità dei depositi di grasso e trasmettere poi informazione a specifici recettori (adipostato), presenti a livello ipotalamico. Se i depositi di grasso sono ridotti, il segnale che arriva all'adipostato è basso e l'ipotalamo risponde stimolando la fame e riducendo la spesa energetica per conservare energia. Quando i depositi di grasso sono abbondanti, avviene l'inverso (15). Numerosi neurotrasmettitori e neuropeptidi interagiscono tra loro creando una rete complessa di segnali, afferenti ed efferenti, che regolano l'equilibrio energetico.

Principali elementi di questo sistema di controllo sono i neuroni peptidergici dell'ipotalamo.

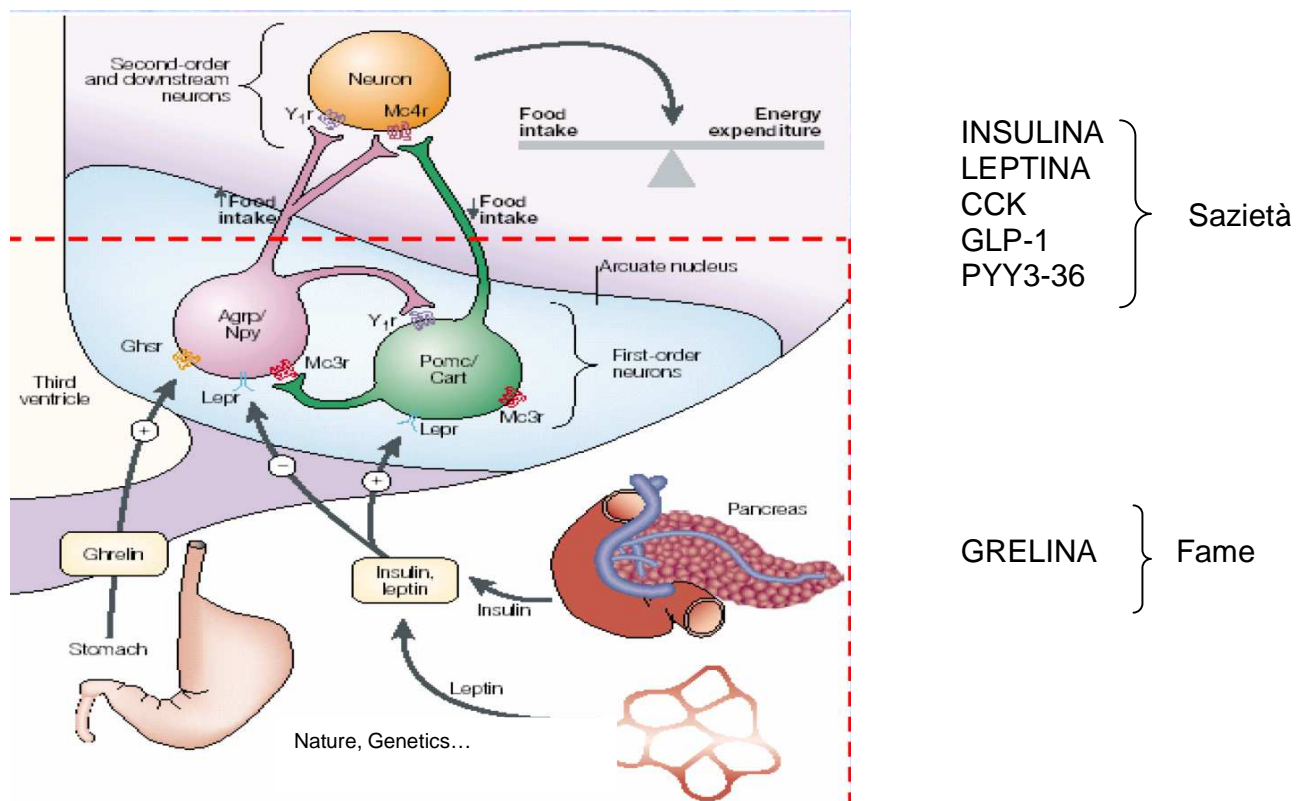
Nell'ipotalamo è localizzato il circuito della melanocortina regolato dalla leptina, prodotta dal tessuto adiposo, che regola il senso di sazietà. La leptina (il cui nome deriva dal greco leptos che vuol dire magro) è un ormone prodotto dalle cellule adipose e la cui concentrazione in circolo è proporzionale al contenuto di grasso corporeo. La leptina oltrepassa la barriera emato-encefalica legandosi al suo recettore ipotalamico (ObRb), presente a livello del SNC in particolare nei nuclei arcuato, laterale, ventromediale e dorsomediale dell'ipotalamo, attivando così dei segnali che inibiscono l'introduzione di cibo ed aumentano il dispendio energetico. Quindi la leptina agisce da regolatore a lungo termine del livello della massa grassa attraverso un meccanismo a feed-back negativo. La leptina regola lo stato energetico dell'individuo guidandolo verso assetti metabolici e comportamentali che innalzano o abbassano lo stato energetico qualora si allontanano dal set-point geneticamente determinato e centralmente controllato (16).

A livello ipotalamico, è presente una popolazione di neuroni che esprime i neuropeptidi oressizzanti cioè stimolanti l'appetito: il Neuropeptide Y (NPY) ed Agouti Related Protein (AgRP), la cui espressione è ridotta dalla leptina. Un'altra popolazione di neuroni presente a livello ipotalamico esprime i neuropeptidi anoressizzanti, che sopprimono l'appetito: Cocaine and Amphetamine Related Transcript (CART) ed il peptide  $\alpha$ -Melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH), derivato dal processo proteolitico, operato dagli enzimi proconvertasi (PC1 e PC2), del gene della proopiomelanocortina (POMC). L'espressione di POMC è indotta dalla leptina (17).

Il Neuropeptide Y (NPY) è un peptide oressizzante prodotto nel nucleo arcuato che aumenta l'assunzione di cibo e riduce il consumo energetico. L'espressione dell'mRNA per l'NPY è inibita dalla leptina. L'AgRP è un peptide ipotalamico che stimola l'assunzione di cibo nel topo, interferendo con il legame specifico tra  $\alpha$ -MSH ed il recettore 4 della melanocortina (MC4R). L'espressione del gene AgRP viene inibito dalla leptina.

A livello dell'ipotalamo laterale, la concentrazione di ormone concentrante la melanina (MCH), un peptide oressizzante, viene aumentata dal digiuno e dalla carenza di leptina. Modificazioni del gene per l'MCH o la somministrazione di un antagonista del recettore MCH1, determina ipofagia e perdita di peso nei roditori. Il glucagone-like peptide-1 (GLP-1) e la neurotensina sono peptidi che inibiscono la capacità del MCH di indurre il senso della fame. La leptina induce una ridotta espressione genica degli endocannabinoidi che agiscono come recettori per i cannabinoidi ed aumentano il senso di fame. Inoltre, la leptina stimola l'espressione di geni che codificano peptidi anoressizzanti. L'  $\alpha$ -MSH, un peptide derivato da POMC, e CART sono peptidi ipotalamici espressi dalla stessa famiglia di neuroni nel nucleo arcuato dell'ipotalamo. Questi peptidi vengono sintetizzati sotto lo stimolo della leptina e inducono anoressia. AgRP e  $\alpha$ -MSH competono, a livello ipotalamico, per il legame ai recettori della melanocortina (MC-Rs), in particolare per il sottotipo 4 (MC4R).

È ampiamente dimostrato che l'interazione tra AgRP ed  $\alpha$ -MSH con i recettori MC4R sia critica per il mantenimento dell'omeostasi energetica (18) (fig.8) .



**Figura 8. Sistema di controllo dell'omeostasi energetica. Nature, Genetics...**

L'attivazione di MC4R da parte di  $\alpha$ -MSH riduce la quantità di cibo assunta, mentre l'inibizione dello stesso da parte di AgRP aumenta il food-intake.

Nell'uomo mutazioni nei geni POMC, PC1, PC2 e MC4R sono correlati ad obesità severa confermando l'importanza di questo pathway nell'omeostasi energetica (18, 19, 20).

Anche i tessuti gastrointestinali convogliano informazioni riguardanti il bilancio energetico verso il cervello, attraverso vie neurali ed endocrine. L'insulina ed il suo recettore sono stati studiati tradizionalmente per il loro ruolo nell'omeostasi del glucosio. Ci sono ora prove crescenti che gli effetti a livello centrale dell'insulina sono paralleli a quelli della leptina; la somministrazione a livello centrale dell'insulina o di insulinomimetici riduce l'assunzione di cibo e la massa corporea, mentre una disfunzione dei recettori insulinici ipotalamici causa iperfagia ed insulino-resistenza.

Un altro peptide, la grelina, prodotto dallo stomaco, dall'intestino, dall'ipofisi e forse dall'ipotalamo, è stato originariamente descritto come un induttore del rilascio di GH, ma più recentemente sono state dimostrate le sue funzioni come peptide oressizzante. L'iniezione intracerebroventricolare di grelina stimola il metabolismo nel ratto, incrementando il peso corporeo attraverso la stimolazione dei neuroni NPY e AgRP. L'iniezione intravenosa di grelina nell'uomo, stimola l'assunzione di cibo e del senso

della fame, attraverso l'interazione con i neuroni che si trovano nei nuclei arcuati dell'ipotalamo e che sono accessibili agli ormoni periferici. L'innalzamento prima di pranzo e la caduta dopo pranzo dei livelli plasmatici di grelina e la correlazione con l'appetito, indicano che questo ormone potrebbe giocare, nell'uomo, un ruolo importante nell'assunzione di cibo. Al contrario della leptina e dell'insulina, che sono rilasciate in proporzione all'accumulo di grasso corporeo ed hanno effetti a lungo termine sull'omeostasi energetica, la grelina è responsabile degli effetti a breve termine in relazione ai pasti. Le concentrazioni circolanti di grelina sono più basse nei soggetti obesi, ma gli attuali studi sono in disaccordo sul fatto che l'assunzione di cibo sopprima o meno i livelli di grelina in questi individui.

Un altro ormone intestinale, il peptide YY3-36 (PYY), un agonista del recettore NPY Y2 che è espresso dai neuroni NPY nel nucleo arcuato, è rilasciato dopo pranzo in relazione al contenuto calorico del pasto. Le iniezioni di PYY diminuiscono la concentrazione di NPY ed incrementano l'attività dei neuroni POMC, riducendo l'assunzione di cibo nei roditori e negli umani (tab.1).

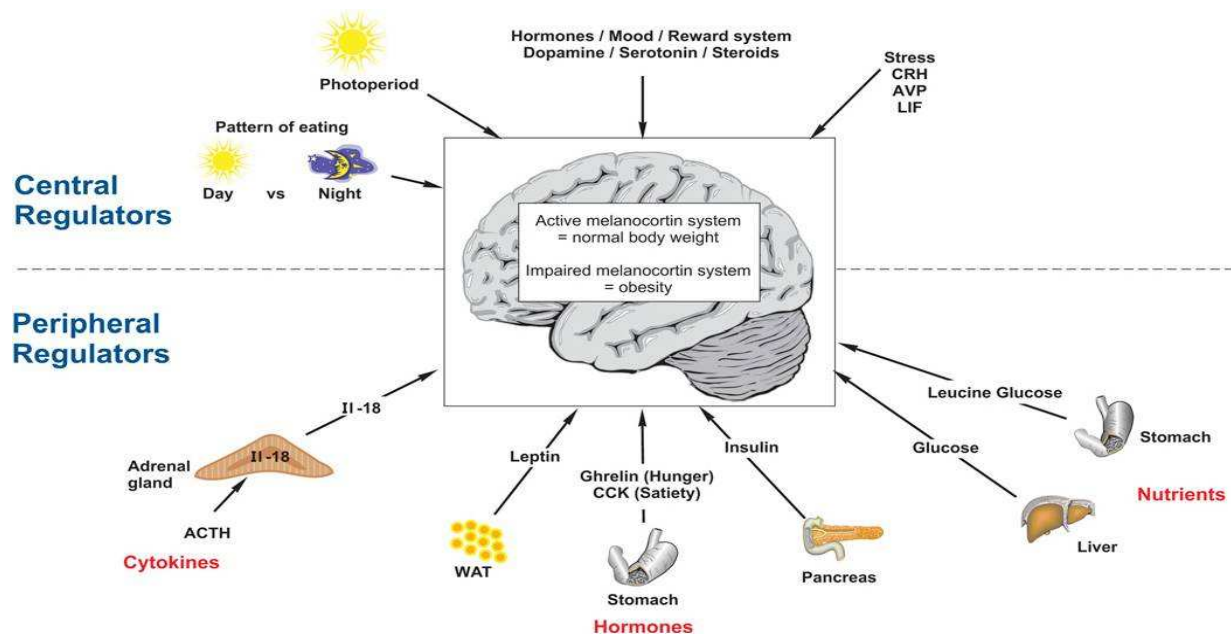
Regolazione dell' appetito nel SNC (nucleo ventro-mediale e paraventricolare dell' ipotalamo, area laterale dell' ipotalamo)	
Fattori oressizzanti	Fattori anoressizzanti
Agouti-related protein	Cocaina, Anfetamine Reg. Transcript
GABA	CART
Galantina	Corticotropin relasing hormone (CRH)
Glutammato	Dopamina
MCH	Recettori della melanocortina (MC3,MC4)
Neuropeptide Y	Melanocyte stimulating Hormone
Norepinefrina	Pro-Opio-Melano-Cortina (POMC)
Opioidi	Neurotensina
Orexina, ipocretina	Serotonina
Segnali diretti al sistema nervoso periferico	
Soppressione	Stimolazione
Amilina	Cortisolo
Bombesina	Gh-relina
GLP1	Glucosio
Glucagone	Insulina
Leptina	
Proteine	
Segnali a partenza dal Sistema Nervoso Centrale	
Sistema nervoso parasimpatico: nervo vago	
Riserva di energia mediante secrezione di insulina glucosio-indotta	
Sistema nervoso simpatico: attivazione alfa adrenergico	
Stress, freddo: lipolisi, produzione di calore, attivazione della tiroide	

**Tabella 1. Fattori regolatori dell'appetito e del bilancio energetico**

La colecistochinina, che è rilasciata in risposta al grasso alimentare, migliora l'assorbimento del cibo, rallentando lo svuotamento gastrico, stimolando la contrazione della colecisti, inibendo l'assunzione di cibo durante il pasto attraverso il sistema afferente vagale.

Il GLP-1, inibisce la motilità gastrointestinale, l'appetito e l'assunzione di cibo. La secrezione di un inibitore gastrico polipeptidico, l'ormone duodenale, non influisce sull'assunzione di cibo, ma favorisce l'obesità attraverso l'immagazzinamento dei vari nutrienti sotto forma di grassi. Tante altre molecole, inclusi altri peptidi, neurotrasmettitori, citochine, ormoni steroidei ed enzimi, influenzano l'omeostasi energetica (fig. 9).





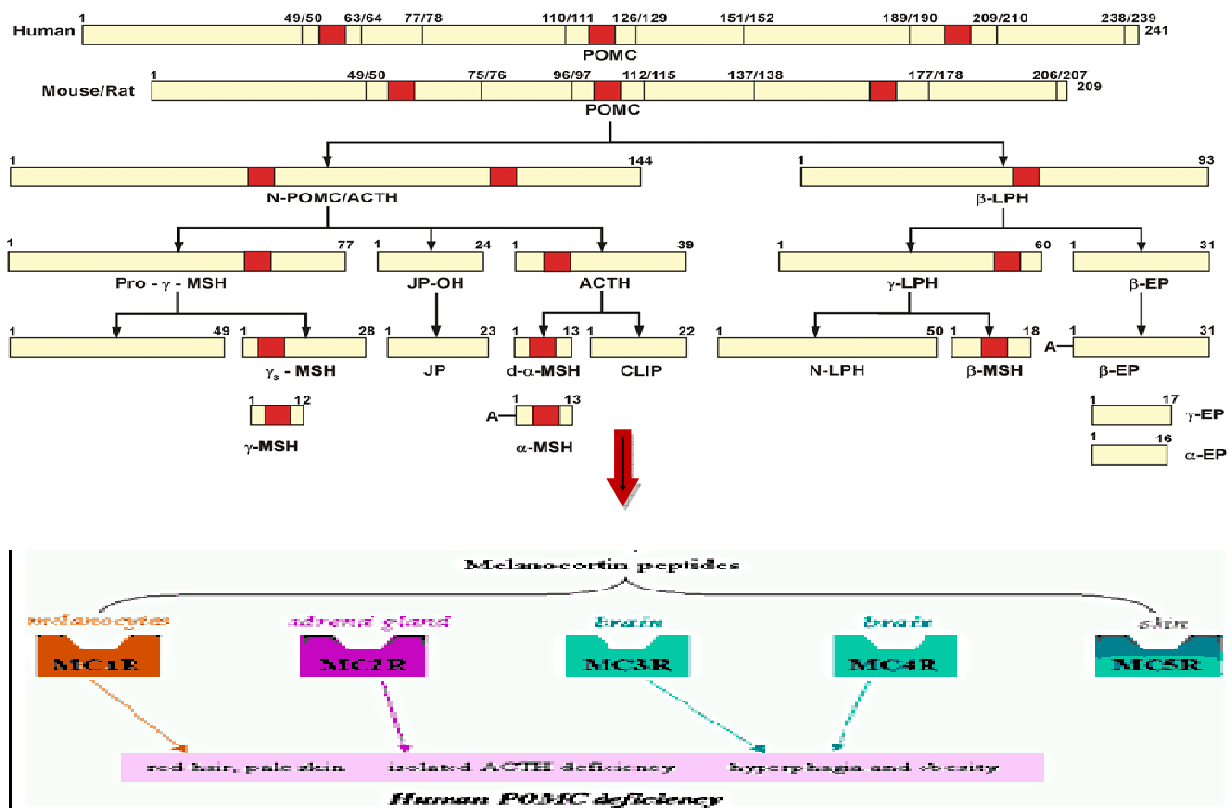
**Figura 9. Regolazione centrale e periferica dell'omeostasi energetica mediata dal sistema melanocortinico** Biochem. J. (2010) 428, 305–324 (Printed in Great Britain) doi:10.1042/BJ20091957

#### 4. SISTEMA DELLA MELANOCORTINA

Un crescente numero di studi ha evidenziato che i neuroni POMC dell'ipotalamo sono importanti nel regolare l'omeostasi energetica e che, il suo peptide-derivato,  $\alpha$ -MSH (l'ormone stimolante i melanociti), con i recettori della melanocortina nel cervello (MC-Rs) giocano un ruolo chiave in questo processo (21).

La proopiomelanocortina umana (POMC) è una proteina di 267 aminoacidi sintetizzata nell'ipofisi, nel nucleo arcuato dell'ipotalamo, nel tratto solitario della medulla, nella pelle, nel sistema immune e in altri tessuti. Essa funge da precursore di numerosi altri peptidi biologicamente attivi derivati da un processing post-traduzionale operato da specifici enzimi, le proconvertasi 1 e 2 (PC1 e PC2), che riconoscono specifici siti di taglio.

Questi peptidi includono l'  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -MSH, l'ormone adrenocorticotropo (ACTH), le lipoproteine e la  $\beta$ -endorfina che hanno attività biologiche differenti a secondo del recettore della melanocortina al quale si legano (fig10) .



**Figura 10. Illustrazione schematica del precursore POMC e dei maggiori peptidi prodotti dal clivaggio endoproteolitico.** Biochem. J. (2010) 428, 305–324 (Printed in Great Britain) doi:10.1042/BJ20091957

I recettori per le melanocortine appartengono alla superfamiglia dei recettori accoppiati alle proteine G con 7 domini transmembrana, la cui stimolazione attiva l'adenilato-ciclasi attraverso la proteina Gs con produzione di cAMP.

Finora sono stati individuati cinque recettori della melanocortina (MCRs) che si diversificano tra loro per la loro distribuzione tissutale e per la loro funzione:

- MC1R è espresso nei melanociti e media gli effetti sulla pigmentazione della pelle e dei capelli.
- MC2R, espresso soprattutto nella corteccia surrenalica, media gli effetti di ACTH sulla sintesi e il rilascio dei glucocorticoidi.
- MC3R e MC4R sono espressi nel cervello e soprattutto nelle aree coinvolte nella regolazione del bilancio energetico. L'MC3R è localizzato nell'ipotalamo e nel sistema limbico ed è altamente espresso nei neuroni arcuati, inclusi i neuroni che esprimono POMC. L'MC4R è più ampiamente distribuito nel cervello, nell'ipotalamo, nel talamo e nella corteccia. Esso è espresso soprattutto nel nucleo paraventricolare e nell'area ipotalamica laterale.
- MC5R è espresso nelle ghiandole esocrine e nel muscolo scheletrico.

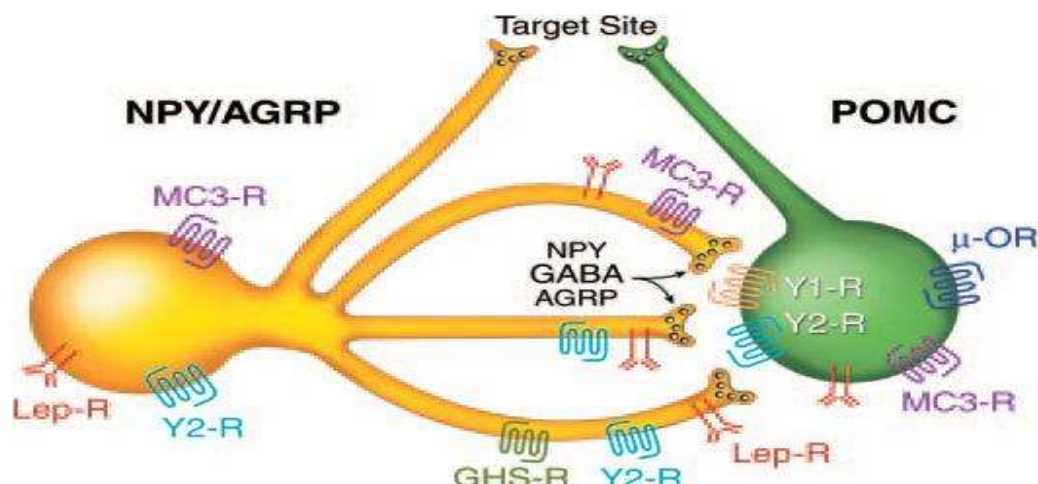
L'alterazione o la distruzione di MC1R, MC2R e MC5R determina, rispettivamente, anomalie nella pigmentazione, nella produzione degli steroidi a livello del surrene, nella funzione delle ghiandole esocrine, ma non alterazioni nell'omeostasi energetica.

Al contrario, MC3R e MC4R giocano un ruolo fondamentale nel bilancio energetico e quindi una loro alterazione o la loro assenza provoca uno scompenso nel bilancio energetico con conseguente iperfagia e obesità.

Questo ed altri studi suggeriscono che il pathway della melanocortina gioca un ruolo chiave nell'omeostasi energetica e che è strettamente regolato. È stato evidenziato che forme monogeniche di obesità sono riconducibili a mutazioni a carico dei geni coinvolti nel circuito della melanocortina: AgRP, CART e POMC ( $\alpha$ -MSH) e che tali mutazioni nel complesso, sono responsabili solo di circa 1-2% dei casi di obesità (22).

#### 4.1 IL Recettore 3 della Melanocortina

Finora sono stati identificati circa 240 geni suscettibili di obesità grave nell'uomo (23). In particolare, è stato rimarcato il ruolo importante del sistema della melanocortina nella regolazione dell'omeostasi energetica e nell'obesità nell'uomo (24,25). Come già ampiamente descritto, le melanocortine sono ormoni peptidici derivanti dal taglio proteolitico di POMC e comprendono  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -MSH ed ACTH. Queste mediano l'azione della leptina sul controllo dell'omeostasi energetica tramite l'interazione con i recettori della melanocortina (MC-Rs) 3 e 4 espressi nel nucleo ipotalamico laterale. I recettori MC3R ed MC4R, regolano l'omeostasi energetica principalmente attraverso il legame competitivo col peptide anoressizzante  $\alpha$ -MSH ed il peptide oressizzante agouti, Ag-RP (fig.11) (25,26,27).



**FIGURA 11. Controllo coordinato dell'omeostasi energetica dai neuroni POMC, NPY e AGRP.**  
*Roger D. Cone-Studies on the Physiological Functions of the Melanocortin System Endocrine Reviews 27(7):736–749. U.S.A. 2006*

Sicuramente il recettore più studiato è MC4R; numerosi sono gli studi presenti in letteratura che descrivono mutazioni in eterozigosi del gene associate a forme precoci

di obesità, accompagnate da un irregolare comportamento alimentare, una severa iperinsulinemia e un incremento nello sviluppo della massa grassa. Il deficit funzionale di MC4R rappresenta la causa più frequente di obesità monogenica nell'uomo con un'incidenza del 4-5% nella popolazione adulta (28-29).

Anche nel laboratorio dove ho svolto il mio dottorato, sono state individuate 4 nuove mutazioni in eterozigosi nel gene che codifica per MC4R in una coorte di 196 soggetti adulti con un grado severo di obesità (BMI>40) residenti in Campania (22).

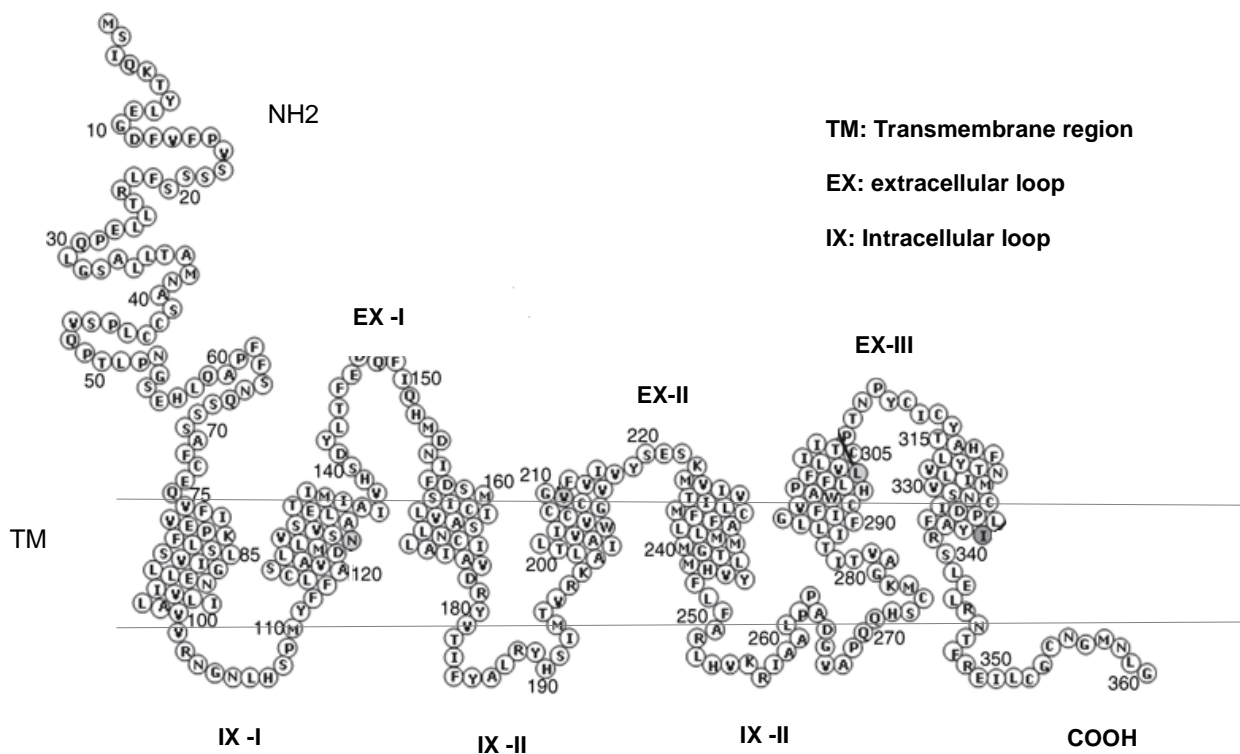
La prima è una mutazione missenso 915 G>C (W174C) localizzata nel quarto tratto transmembrana, una regione importante per la corretta traduzione del segnale; la seconda e la terza mutazione individuate sono mutazioni nonsense che cadono nel dominio N-terminale. In particolare la mutazione 520 C>T (Q43X), introduce un precoce codone di stop e produce un breve peptide tronco; e una delezione puntiforme 448delA (S19fsX51), che causa lo scivolamento della cornice di lettura, producendo un peptide tronco di 51 aa dei quali solo i primi 18 appartengono alla sequenza corretta della proteina (65, 66). La quarta mutazione identificata è una mutazione missenso 1342 A>G (I317V) che cade nel dominio C-terminale del recettore, in una regione ritenuta importante per il corretto "targeting" della proteina sulla superficie cellulare. In tale studio sono state inoltre identificate anche 2 varianti polimorfiche già descritte: V103I e T112M (tabella 2). Lo studio in vitro di tali mutazioni ha evidenziato che W174C ha un effetto negativo sul recettore wt e A175T resta intrappolata nel citosol giustificando la ridotta attività. (30).

Base sostituita	Proteina	Posizione	Obesi n (%)	Controlli normali n (%)
.....				
C520T	Q43X	N-Ter.	1	0
Δ4448	S19fsX51	N-Ter.	1	0
G915C	W174C	TM 4	1	0
A1342G	I317V	C-Ter.	1	0
A700G	V103I	TM 2	1	2
C728T	T112M	ECL 1	1	0
				Mutazioni
				Polimorfismi
TM, Dominio transmembrana ECL, Ansa extracellulare Ter, Terminale				
.....				

**Tabella 2: Mutazioni e polimorfismi evidenziati in MC4R nella coorte dei soggetti esaminati (22).**

Molto meno ricca è la letteratura che riguarda MC3R; il gene che codifica per l'isoforma 3 del recettore melanocortinico (MC3R), è localizzato sul cromosoma 20 e mappa nella regione 20q13.2-q13.3. Il gene codifica per una proteina di 360 aminoacidi (1083 nucleotidi, Genbank L06155) associata alle proteine G (fig.12).

Nell'uomo sono state identificate tre mutazioni missenso in eterozigosi (Ile183Asn, Ala70Thr, and Met134Ile) associate ad obesità infantile ad insorgenza precoce (tab. 2). I soggetti eterozigoti per le tre mutazioni presentano un aumento della massa grassa e più alti livelli di leptina rispetto ai soggetti obesi non portatori di mutazioni nel gene MC3R; sono state inoltre identificate alcune varianti polimorfiche associate a insorgenza precoce dell'obesità infantile (31,32).



**FIGURA 12. Rappresentazione schematica della struttura aminoacidica della proteina MC3R.**  
**Da: Doreen Zegers<sup>1</sup>. 2010 Jun 10. Identification of Three Novel Genetic Variants in the Melanocortin-3 Receptor of Obese Children. Obesity (2010)**

Topi *knock-out* per questo gene hanno un aumento della massa grassa nonostante la diminuita assunzione di cibo, suggerendo un ruolo per MC3R nella regolazione dell'omeostasi energetica. Inoltre, sia i topi *knock-out* per MC3R sia quelli per MC4R sono entrambi obesi ma, a differenza dei secondi, i topi *knock-out* per MC3R non sono iperfagici. Inoltre, i topi *knock-out* per entrambi i geni presentano un fenotipo obeso più grave rispetto ai topi MC3R<sup>-/-</sup> e ai topi MC4R<sup>-/-</sup>, dimostrando che entrambi i geni sono importanti e non ridondanti (33). Recenti studi hanno dimostrato che, effettuando un'analisi funzionale di un mutante di MC3R (I183N), la mutazione stessa abolisce completamente l'attivazione del recettore da parte dell'agonista. (33-38).

<b>Tabella 2 mutazioni e polimorfismi noti in letteratura</b>	
Ile 183 Asn Ala 70 Thr Met 134 Ile N128S, V211I, L299V	<p>Yung Seng Lee., et al. The role of Melanocortin 3 Receptor Gene in Childhood Obesity Diabete Publish Ahead Of Print, published online July 16, 2007</p> <p>Doreen Zegers1. 2010 Jun 10. Identification of Three Novel Genetic Variants in the Melanocortin-3 Receptor of Obese Children. <i>Obesity</i> (2010) doi:10.1038/oby.2010.127</p>
A 293 T I 335 S X 361 S	<p>Ya-Xiong Tao et al (2007) Functional characterization of novel melanocortin-3 receptor mutations identified from obese subjects. <i>Biochimica et Biophysica Acta</i> 1772 1167–1174</p>
<b>POLIMORFISMI</b>	
Thr 6 Lys Val 81 Ile S69S, L95L, I226I	<p>Yung Seng Lee., et al. The role of Melanocortin 3 Receptor Gene in Childhood Obesity Diabete Publish Ahead Of Print, published online July 16, 2007</p> <p>Doreen Zegers1. 2010 Jun 10. Identification of Three Novel Genetic Variants in the Melanocortin-3 Receptor of Obese Children. <i>Obesity</i> (2010) doi:10.1038/oby.2010.127</p>

## **5. Scopo della tesi**

Il presente progetto di ricerca prevede la ricerca di nuove varianti nel gene che codifica per MC3R associate ad obesità grave nella popolazione campana, dove è alta l'incidenza di obesità.

Durante questi tre anni ho cominciato uno *screening* del gene MC3R in una coorte di 196 soggetti adulti gravemente obesi (BMI >40 ) e su 100 soggetti normopeso (gruppo controllo) allo scopo di genotipizzare tale popolazione.

La coorte di soggetti gravemente obesi è la stessa coorte che è stata oggetto dello screening di MC4R (22).

L'analisi del tipo di mutazioni e della frequenza di tali mutazioni presente in un campione di soggetti fortemente obesi residenti in Campania servirà a dare informazioni sulle varianti anche in associazione a quelle evidenziate per MC4R sull'obesità grave in Campania.

## **6. Materiali e metodi**

### **6.1 – Soggetti**

La popolazione in studio era costituita da 196 (111 femmine: 56.6%; 85 maschi: 43.4%) pazienti severamente obesi non imparentati, di età compresa tra i 17 e 70 anni, reclutati dal Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università "Federico II" di Napoli. Tutti i soggetti erano caucasici e vivevano in Italia da oltre tre generazioni. I criteri di inclusione erano: assenza di diabete trattato, assenza di malattie coronariche, assenza di ipertensione trattata e presenza di obesità grave (BMI>40 kg/m<sup>2</sup>). Per tutti i soggetti erano valutati i seguenti parametri: BMI, circonferenza vita e fianchi (in cm), massa grassa e magra mediante impedenziometria (39). Le caratteristiche biochimico cliniche dei soggetti severamente obesi oggetto dello studio sono descritte in un precedente lavoro (22) e sono riportate nella Tabella 3.

Ho genotipizzato 50 dei 196 soggetti obesi di cui 22 maschi e 28 femmine di età compresa tra 17 e 70 anni. Ho analizzato anche soggetti normopeso (BMI<25 kg/m<sup>2</sup>, range di età: 26-76 anni) reclutati dall'ambulatorio di Medicina di Laboratorio. Su tali soggetti sono stati calcolati i valori di riferimento per i livelli di leptina, adiponectina e resistina sierica. Tutti i partecipanti hanno firmato un consenso informato allo studio. La ricerca è stata condotta in accordo con i principi della dichiarazione di Helsinki II.



Tabella 3. Caratteristiche generali e biochimiche dei pazienti severamente obesi (media e deviazione standard) n. Tot. 50

	Males	Females
No.	22	28
Age, years	32.3 (10.5)	32.4 (12.5)
BMI, kg/m <sup>2</sup>	48.2 (8.3)	49.3 (8.1)
Waist-to-hip ratio	1 (0.06) <sup>b</sup>	0.96 (0.07)
Fat-free mass, <sup>c</sup> %	56.9 (5.4) <sup>b</sup>	48.3 (6.0)
Fat mass, <sup>c</sup> %	43.1 (5.5) <sup>b</sup>	51.7 (6.8)
Systolic blood pressure, mmHg	134.1 (16) <sup>b</sup>	123.2 (16)
Diastolic blood pressure, mmHg	85.9 (10) <sup>b</sup>	79.3 (10)
Heart rate, beats/min	79.8 (12)	78.8 (10)
Total cholesterol, mmol/L	4.5 (0.8) <sup>d</sup>	4.9 (1.0)
HDL-cholesterol, mmol/L	1.0 (0.2) <sup>b</sup>	1.2 (0.2)
LDL-cholesterol, mmol/L	2.8 (0.8)	3.0 (0.9)
Triglycerides, mmol/L	1.7 (1.1)	1.5 (0.6)
AST, <sup>e</sup> U/L	29.9 (13.0) <sup>d</sup>	24.6 (14.2)
ALT, U/L	52.6 (31.5) <sup>b</sup>	32.1 (22.3)
Leptin, <sup>f</sup> µg/L	67.6 (48.1) <sup>b</sup>	141.5 (54.4)
Insulin, mIU/L	26.9 (18.5) <sup>d</sup>	20.3 (9.5)
Glucose, mmol/L	5.4 (1.8)	5.1 (0.8)
HOMA <sup>g</sup>	6.5 (4.4) <sup>b</sup>	4.6 (2.4)
TSH, mIU/L	1.7 (0.8)	2.3 (2.5)
FT <sub>3</sub> , ng/L	2.9 (0.5)	2.9 (0.5)
FT <sub>4</sub> , ng/L	62 (51)	59 (53)
ACTH, ng/L	39.9 (37.7)	24.4 (11.1)
Cortisol, <sup>h</sup> µg/L	136.7 (44.8)	133.2 (59.8)

<sup>a</sup> All values are the mean (SD).

<sup>b</sup>  $P < 0.001$ .

<sup>c</sup> Measured in 86 patients (39 males and 47 females).

<sup>d</sup>  $P < 0.05$ .

<sup>e</sup> AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; HOMA, homeostasis model assessment; TSH, thyroid-stimulating hormone; FT<sub>3</sub>, free triiodothyronine; FT<sub>4</sub>, free thyroxine.

<sup>f</sup> Reference intervals for normal-weight controls (see the section on patients in the *Materials and Methods*) were 1.1–19.7 µg/L in males and 2.3–56.1 µg/L in females.

<sup>g</sup> HOMA: fasting insulin (mIU/L)/[22.5 × e<sup>-ln(glucose, in mmol/L)</sup>].

<sup>h</sup> Measured in plasma, whereas all other biochemical values were measured in fasting serum.

(22) Adattata da Pasqualina Buono, et al. Six Novel Mutations in the Proopiomelanocortin and Melanocortin Receptor 4 Genes in Severely Obese Adults Living in Southern Italy. *Clinical Chemistry* 51:8, 1358–1364 (2005).



## 6.2 Amplificazione del DNA genomico e sequenziamento

Il DNA genomico è stato estratto da 50 soggetti obesi e dai 100 soggetti normopeso mediante il kit (*Nucleon BACC-2, Amersham Biosciences Europe*, Milano, Italia).

Il DNA estratto, opportunamente diluito, è stato quantizzato mediante lettura spettrofotometrica dell'assorbimento di luce a 260 nm, lunghezza d'onda assorbita specificamente dagli acidi nucleici. La quantità di DNA è stata determinata mediante la seguente formula:

$$[\text{DNA}] \text{ (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} \cdot \text{f.d.} \cdot 50$$

con:  $A_{260}$  = valore dell'assorbanza rilevata dallo strumento, f.d. = fattore di diluizione 50 = quantità di DNA (ng/μl) la cui assorbanza a 260 nm è pari ad 1. Inoltre, è stato verificato anche il rapporto tra l'assorbanza a 260 nm e 280 nm, che deve essere compreso tra 1,7 e 2,00, per avere indicazioni sul grado di contaminazione proteica del campione.

Ogni campione è stato poi diluito alla concentrazione di 0.2 ng/μl, concentrazione ottimizzata per avere migliori risultati durante la reazione di amplificazione.

Le sequenze codificanti di MC3R sono state amplificate utilizzando primers disegnati mediante il programma PRIMER 3 v 0.2, selezionati per generare frammenti che coprissero l'unico esone per intero (frammenti I, II, III), e per ottenere dei frammenti sovrapposti per coprire l' esone.

Il gene MC3R è stato amplificato con BIO-RAD iCycler PCR in un volume finale di 50 μl, contenente una mix (100 ng/ul di ogni primer, 1x PCR buffer (miscela di 4 nucleotidi: 200 μM ogni dNTP, MgCl 2M) 0.5 U Taq DNA polymerase) e 100 ng di DNA genomico. Le condizioni di amplificazione consistono in una denaturazione iniziale a 94°C, 2 min, seguita da 94°C, 20 sec, 58-60°C, 20 sec, e 72°C, 4 5 sec, 32 cicli; 72°C, 5min, 1 ciclo. In Tabella 4 sono mostrate le condizioni di PCR.

Tabella 4. Primers e condizioni di PCR

Nome	Sequenza	Posizione 5'	bp	Tm (°C)
M(1)-Fw	5'- AAAGTTGCATGCTAGCTACTAAC-3'	134102	517	60
M(1)-Rw	5'-AGTACATCGGGGAGTGCAG-3'	134619		60
M(2)-Fw	5'-TGAGCAGGTCTTCATCAAGC-3'	134501	609	60
M(2)-Rw	5'-CATGCATGAGTGTGCTGTG-3'	135110		60
M(3)-Fw	5'-CCTCTACGTGCACATGTTCC-3'	135011	619	58
M(3)-Rw	5'-GCCTTCGCTGATTCTCCCA-3'	135630		58

I frammenti di PCR sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1 %, i prodotti di PCR sono stati poi successivamente sequenziati presso il CEINGE Biotecnologie Avanzate (Napoli). Il sequenziamento viene normalmente effettuato con il metodo di Sanger (terminatori dideossi) utilizzando dei sequenziatori automatici. Attualmente i più efficienti utilizzano 96 capillari e consentono di ottenere circa 100.000 bp per ogni *run* (fig 15).

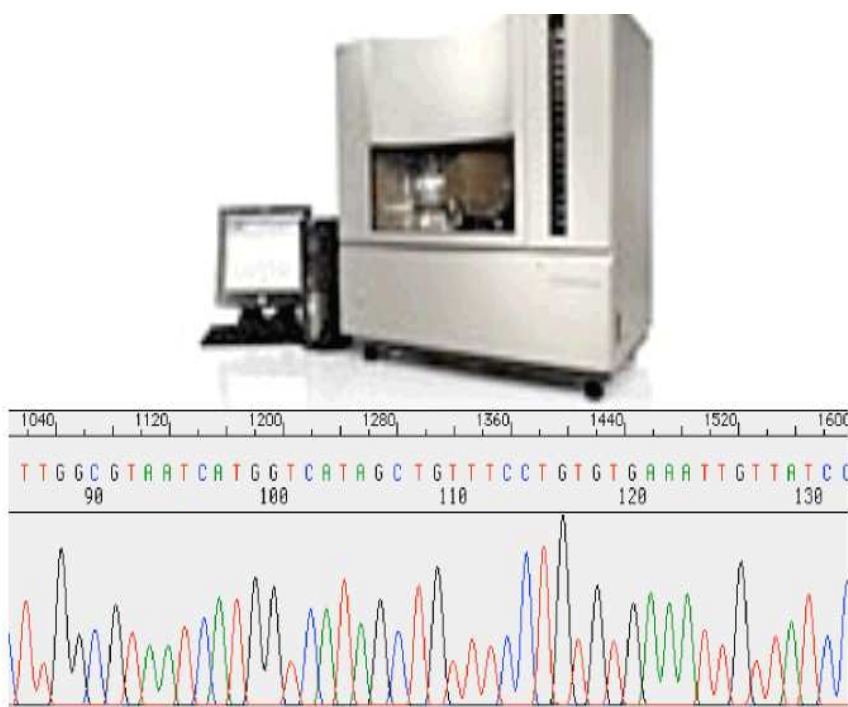


Fig. 15 ABI 3730xl DNA analyzer

## 7. Risultati

L'analisi del gene MC3R effettuata nella popolazione di studio rispetto al gruppo di controllo ha evidenziato 2 polimorfismi già descritti in letteratura (tab. 2).

	Cambio Nucleotidico	Cambio Aminoacidico	Obesi, n (%) 50	Controlli, n (%) 100
POLIMORFISMI	c.17 C>A / c.241 G>A (eterozigosi composita)	p. Thr 6 Lys / p. Val 81 Ile Frequenza allelica 6%	6 (12%) Frequenza allelica 6%	6 (6%)
	c.17 C>A / c.241 G>A (omozigosi)	p. Thr 6 Lys / p. Val 81 Ile	1 (2%)	0 (0%)
MUTAZIONI	c. 283 C > T eterozigosi	p. Leu95Leu	1 (2%)	0 (0%)

**Tabella 2. Elenco mutazioni e polimorfismi trovati nel gene MC3R**

Il polimorfismo in eterozigosi c.17 C>A / c.241 G>A è stato identificato in sei soggetti obesi ed in sei soggetti normopeso con una percentuale del 12% negli obesi e del 6% negli adulti normopeso. Lo stesso polimorfismo (c.17 C>A / c.241 G>A) in omozigosi è stato riscontrato in un solo soggetto obeso con una percentuale del 2%. E' stato inoltre identificata una sola mutazione in eterozigosi (nt 283 C >T) presente solo in un soggetto obeso che non comporta cambio aminoacidico (L95L) con una percentuale del 2%.

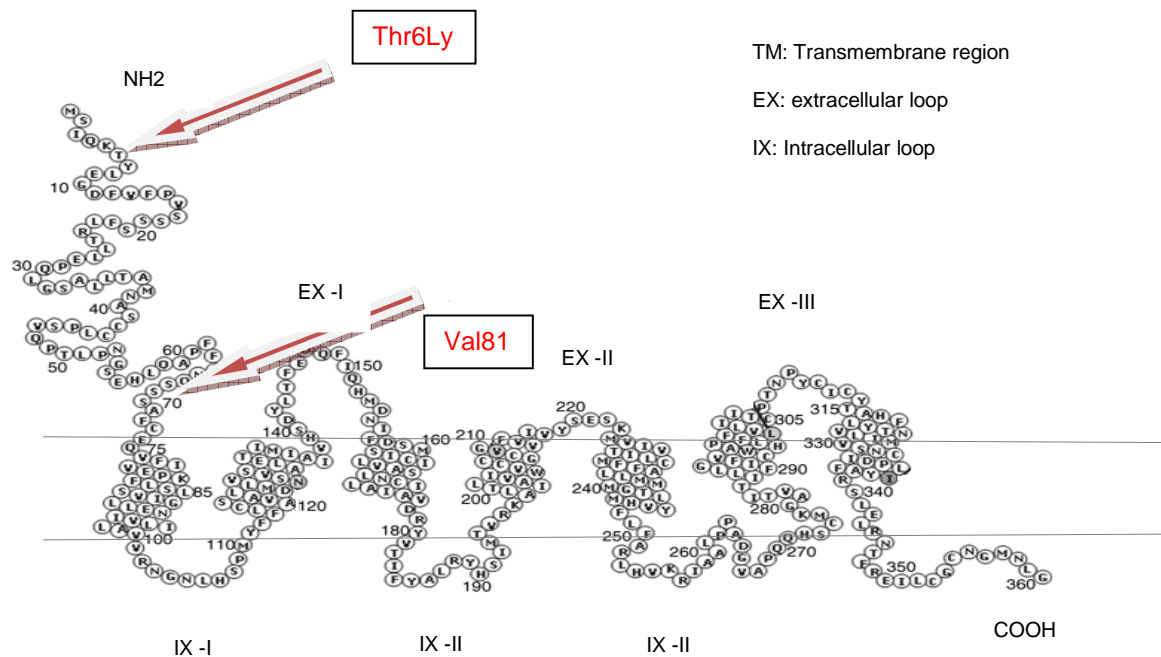


Figura 16. Rappresentazione schematica della struttura aminoacidica della proteina MC3R. In rosso varianti evidenziate nello studio. Da: Doreen Zegers<sup>1</sup>. 2010 Jun 10. Identification of Three Novel Genetic Variants in the Melanocortin-3 Receptor of Obese Children. Obesity (2010)

## 8. Discussione

Studi di associazione in famiglie hanno evidenziato come nell'insorgenza dell'obesità la componente genetica giochi un ruolo rilevante oscillante tra il 10-70%. Tra i geni coinvolti nella regolazione del peso corporeo quelli MC3R e MC4R, appartenente al circuito della melanocortina, sembrano molto promettenti. Il sistema della melanocortina, che include  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - MSH, ACTH (peptidi derivati dal clivaggio di POMC) e i recettori della melanocortina (MCR-s), rappresentano geni le cui mutazioni sono prevalentemente associate con obesità grave nell'uomo. In particolare mutazioni a carico di MC4R sembrano rappresentare forme geniche responsabili di obesità nell'uomo.

La genotipizzazione di MC3R su 50 soggetti severamente obesi ha evidenziato 2 polimorfismi già descritti in letteratura. Il polimorfismo in eterozigosi c.17 C>A / c.241 G>A è stato identificato in sei soggetti obesi ed in sei soggetti normopeso mentre lo stesso polimorfismo (c.17 C>A / c.241 G>A) in omozigosi è stato riscontrato in un solo soggetto obeso.

Un recente lavoro ha dimostrato che la presenza in omozigosi delle due varianti polimorfiche *Thr 6 Lys* e *Val 81 Ile* in MC3R è associata a insorgenza precoce dell'obesità (40). Entrambe le varianti in omozigosi erano state identificate solo tra i bambini che erano in sovrappeso con un BMI > 95° percentile. Questi bambini presentavano elevati livelli di massa grassa, alti livelli di insulina e leptina, rispetto ai bambini normopeso o ai bambini eterozigoti per le varianti polimorfiche descritte. Inoltre l'analisi funzionale in vitro delle due varianti polimorfiche in omozigosi ha mostrato una ridotta produzione intracellulare di c-AMP (in vitro) rispetto allo studio condotto con le stesse varianti polimorfiche in eterozigosi in seguito al legame del ligando al recettore. E' interessante notare che le due varianti polimorfiche Thr6Lys e Val81Ile si trovano, rispettivamente, nella regione NH2-terminale extracellulare e nel primo tratto dell'elica transmembrana della proteina MC3R. Entrambe le mutazioni potrebbero influire sulla funzionalità di MC3R, in particolare si ritiene che proprio il primo tratto transmembrana, dove cade una delle due varianti polimorfiche (Val81Ile), sia coinvolto nel legame con il ligando  $\alpha$ -MSH (fig.16). Mediante studi di affinità di legame è stato dimostrato, che il doppio mutante in omozigosi ha una ridotta capacità di legame, vi è cioè una diminuita affinità con il ligando e  $\alpha$ -MSH, supportato anche da diminuita produzione di c-AMP intracellulare.

In conclusione, le varianti in MC3R sono state evidenziate nel 9,3% della coorte esaminata (14/150); tali risultati sono completamente in accordo con i recenti dati della letteratura relativi alla popolazione europea (41,42). Infine non sono state evidenziate negli stessi soggetti portatori delle varianti in MC3R varianti per MC4R. I dati funzionali riportati sugli studi in vitro supportano l'ipotesi che tali varianti possono essere causa di obesità nei soggetti portatori.

## Bibliografia

1. Korner J, Aronne LJ. The emerging science of body weight regulation and its impact on obesity treatment. *J Clin Invest* 2003;111:565–70.
2. Marra M, Scalfi L, Contaldo F, Pasanisi F. Fasting respiratory quotient as a predictor of long-term weight changes in non-obese women. *Ann Nutr Metab* 2004;48:189–92.
3. Rashmi Sinha et al (2009). Meat Intake and Mortality. A Prospective Study of Over Half a Million People *Arch Intern Med.* 2009;169(6):562-571
4. Prospective Studies Collaboration, Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Collins R, Peto R. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet.* 200; 373(9669):1083-96.
5. Prospective Studies Collaboration, Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Collins R, Peto R.5. Andrew M Prentice<sup>1,2</sup>. The emerging epidemic of obesity in developing countries. *International Journal of Epidemiology* 2006;35:93–99
6. Flegal K.M., Carroll M.D., Ogden C.L., et al. (2002). Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *JAMA* 288(14): 1723-7.
7. Flegal K.M., Carroll M.D., Ogden C.L., et al. (2010). Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA*.2010;303(3):235-241
8. Rapporto Annuale ISTAT 2007
9. G. Valerio, L. Scalfi, C. De Martino, A. Franzese, A. Tenore, F. Contaldo (2003). Comparison between different methods to assess the prevalence of obesity in a sample of Italian children. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 16(2): 211-216.
10. Schwartz MW, Woods SC, Porte DJ, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake [Review]. *Nature* 2000;404:661–71
11. Bruch H., *Patologia del comportamento alimentare*, Feltrinelli Editore, Milano, 2000.
12. Gupta A, Gupta V. (2010). Metabolic syndrome: What are the risks for humans *Biosci Trends*;4(5):204-12.

13. Executive summary of the third report of the National cholesterol Education Program (NCEP) Export Panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adult (Adult treatment Panel III). 2001 JAMA 285: 2486-2496,
14. Christopher G.Bell, Andrew J.Walley and Philippe Froguel (2005). The genetics of human obesity. *J.Nature* 6:221-234
15. Coll AP, Farooqi IS, Challis BG, Yeo GS, O'Rahilly S. Proopiomelanocortin and energy balance: insights from human and murine genetics [Review]. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2557–62.
16. Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, Lechler RI, DePaoli AM, O'Rahilly S. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest*. 2002;110(8):1093-103.
17. Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by *POMC* mutations in humans. *Nat Genet* 1998;19:155–7.
18. Raffin-Sanson ML, de Keyzer Y, Bertagna X. Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions : from physiology to pathological conditions (Review). *Eur J Endocrinol* 2003;149:79-90.
19. Echwald SM, Sørensen TIA, Andersen T, Tybjaerg-Hansen A, Clausen JO, Pedersen O. Mutational analysis of the proopiomelanocortin gene in Caucasians with early onset obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;23:293–8.
20. Challis BG, Pritchard LE, Creemers JWM, Delplanque J, Keogh JM, Luan J, et al. A missense mutation disrupting a dibasic prohormone processing site in pro-opiomelanocortin (POMC) increases susceptibility to early-onset obesity through a novel molecular mechanism. *Hum Mol Genet* 2002;11:1997–2004.
21. Sharon L. Wardlaw (2001). Obesity as a Neuroendocrine Disease: Lessons to Be Learned from Proopiomelanocortin and Melanocortin Receptor Mutations in Mice and Men.
22. Pasqualina Buono,<sup>1,2,3</sup> Fabrizio Pasanisi,<sup>4</sup> Carmela Nardelli,<sup>2</sup> Luigi Ieno,<sup>2,3</sup> Silvana Capone,<sup>3</sup> Rosario Liguori,<sup>2,3</sup> Carmine Finelli,<sup>4</sup> Giovannangelo Oriani,<sup>3,5</sup> Franco Contaldo,<sup>4</sup> and Lucia Sacchetti<sup>2,3</sup>. Six Novel Mutations in the

Proopiomelanocortin and Melanocortin Receptor 4 Genes in Severely Obese Adults Living in Southern Italy. *Clinical Chemistry* 51:8, 1358–1364 (2005).

23. Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Pérusse L, Bouchard C (2006) The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (SilverSpring)* 14: 529-644

24. Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T and O'Rahilly S (2003) Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N. Engl. J. Med.* 348: 1085–1095.

25. Lee YS (2009) The role of leptin-melanocortin system and human weight regulation: lessons from experiments of nature. *Ann Acad Med Singapore.* 38(1):34-11.

26. Cowley M.A et al (1999). Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of cellular basis for adipostat. *Neuron.* 24: 155-163.

27. Roger D.. Cone-Studies on the Physiological Functions of the Melanocortin System *Endocrine Reviews* 27(7):736–749. U.S.A. 2006 by The Endocrine Society doi: 10.1210/er.2006-0034

28. Ollmann MM et al (1997) Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278: 135-138

29. Farooqui I.S. et al. (2000). Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin receptor 4 deficiency. *J.Clin.Invest.* 106: 271-279.

30. Alfieri A, Pasanisi F, Salzano S, Esposito L, Martone D, Tafuri D, Daniele A, Contaldo F, Sacchetti L, Zagari A, Buono P. (2010) Functional analysis of melanocortin-4-receptor mutants identified in severely obese subjects living in Southern Italy. *Gene.* 457(1-2):35-41.

31. Lee YS et al (2002) A novel melanocortin 3 receptor gene (MC3R) mutation associated with severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(3):1423-6

32. Lee YS et al (2007) The role of melanocortin 3 receptor gene in childhood obesity. *Diabetes* 56: 2622-2630

33. Min Chen et al (2005) Molecular Characterization of Human Melanocortin-3 Receptor Ligand-Receptor Interaction. *Biochemistry* 2006, 45, 1128-1137

34. Chen AS et al (2000) Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet* 26:97–102



35. M. Mencarelli et al (2008). Sporadic mutations in melanocortin receptor 3 in morbid obese individuals. *European Journal of Human Genetics* 16, 581–586
36. Kathleen G. MOUNTJOY (2010). REVIEW ARTICLE Functions for pro-melanocortin-derived peptides in obesity and diabetes. *Biochem. J.* 428, 305–324 (Printed in Great Britain)
37. Yung Seng Lee., et al. The role of Melanocortin 3 Receptor Gene in Childhood Obesity Diabete Publish Ahead Of Print, published online July 16, 2007
38. Ya-Xiong Tao et al (2007) Functional characterization of novel melanocortin-3 receptor mutations identified from obese subjects. *Biochimica et Biophysica Acta* 1772 1167–1174
39. Doreen Zegers<sup>1</sup>. 2010 Jun 10. Identification of Three Novel Genetic Variants in the Melanocortin-3 Receptor of Obese Children. *Obesity* (2010) doi:10.1038/oby.2010.127
40. Ningping Feng et al (2005) Co-occurrence of Two Partially Inactivating Polymorphisms of *MC3R* Is Associated With Pediatric-Onset Obesity. *Brief Genetics Report DIABETES*, VOL. 54.
41. Nicola Santoro, et al (2007) Effect of the melanocortin-3 receptor C17A and G241A variants on weight loss in childhood obesity<sup>1–3</sup>. *Am J Clin Nutr* 2007;85:950 –3.
42. Yang Y.K., Harmon C.M. (2003). Recent developments in our understanding of melanocortin system in the regulation of food intake. *Obesity*. 4: 239-248. Review.